

アデノウイルスベクター

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、アデノウイルスのファイバーの HI ループに外来ペプチドが付与されたファイバーミュータントアデノウイルスベクターの作製方法に関する。

2. 関連技術の説明

アデノウイルスベクターは、種々のタイプの細胞へ in vivo または in vitro で遺伝子を導入するための魅力的なビヒクルとして汎用されている。

アデノウイルスはエンベロープを持たず、252 個のカプソメアよりなる正 20 面体構造をしている。そのうち頂点にある 12 個のカプソメアは突起構造を持ったペントン（ペントンベースとファイバーから成る）と呼ばれ、他の 240 個はヘキソンと呼ばれる。ウイルスの細胞内への侵入（感染）は、ファイバーが受容体の CAR に結合し（詳細については、Bergelson J M ら、Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 275:1320-1323, 1997 を参照されたい）、その後ペントンベースの RGD モチーフが細胞表面上のインテグリンに結合することによって起こる (Bai M, Harfe B, Freimuth P, Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells., J Virol 67: 5198-5205, 1993 ; Wickham T J ら、Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell 73:309-319, 1993)。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシド蛋白質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して、細胞質内に侵入する。従って、細胞表面上の受容体である CAR に、ウイルスのファイバーが結合するのが第一ステップであり、ファイバーを修飾することにより、ベクターの感染域を変えることができると考えられる (Paillard,

F., Dressing up adenoviruses to modify their tropism. Hum Gene Ther 10:2575-2576, 1999)。

ファイバー遺伝子はウイルス後期遺伝子の L5 領域に位置し、5 型ウイルスにおいては 581 アミノ酸からなり 3 量体を形成している。その構造はテール、シャフト、ノブの部分に分けられ、C 末端のノブが受容体の CAR と結合する。

従来のアデノウイルスベクターの大きな問題点として、ベクターの感染域に組織特異性がなく、全身投与した場合多くの組織細胞に非特異的に移行すること、また、アデノウイルス受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) ; 遺伝子治療のためのベクターとして通常用いられているアデノウイルス 2 型や 5 型における受容体。詳細については、Bergelson J M ら、上掲、を参照されたい) の発現がない細胞には感染できないことがあげられる。

当初、ファイバー分子の C 末端にヘパラン硫酸との親和性があるポリリジン配列を有したアデノウイルスベクターが作製され、このベクターが期待通り、広い感染域をもつことが報告された (Wickham T J ら、Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins., J. Virol. 71:8221-8229, 1997 ; Yoshida Y ら、Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma., Hum Gene Ther 9:2503-2515, 1998 ; Gonzalez R ら、Increased gene transfer in acute myeloid leukemic cells by an adenovirus vector containing a modified fiber protein., Gene Ther. 6: 314-320, 1999 ; Bouri K ら、Poly-lysine Modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction., Hum Gene Ther 10:1633-1640, 1999)。しかしながら、この領域への外来ペプチドの挿入は、ファイバーの 3 量体形成を阻害し、ウイルスのタイターが野生型のファイバーを有するベクターに比べ 1-2 オーダー以上劣ること、また、ファイバーの C 末端はウイルスの内側に向かっていることが明らかとなり、現在では外来ペプチドの挿入に最適な部位ではないと考えられている。

1998 年、Curriel らのグループはファイバーの HI ループがウイルスの表面につぎだした構造をとっていることに着目し、この部位へ外来ペプチドを挿入するとウイルス表面にペプチドを表現できること、ウイルスの増殖を全く阻害しないことを報告し、

外来ペプチドの表現部位として最適である可能性を示した (Krasnykh V I ら、Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob., J Virol 72:1844-1852, 1998 ; Dmitriev I ら、An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a Coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism., J Virol 72:9706-9713, 1998)。しかしながら、彼らはこのようなベクターを特別な大腸菌を用いた相同組換えを利用した方法で作製しており、その作製法は現状ではそれほど簡便ではないため、広く普及するには至っていない。

発明の主題および概要

そこで本発明は、ファイバーの HI ループコード遺伝子配列に簡便な操作で任意のペプチドを導入した、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの作製方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ファイバーの HI ループをコードする遺伝子領域に、ユニークな制限酵素の認識部位を挿入することにより、該領域に任意のペプチドをコードするオリゴ DNA を簡便に導入できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、ファイバーの HI ループコード遺伝子配列に、ユニークな制限酵素認識配列を挿入し、該遺伝子配列中に外来ペプチドコード DNA を導入することを特徴とする、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの作製方法である。

また本発明は、上記の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルスベクターである。

さらに本発明は、ファイバーの HI ループコード遺伝子配列に、ユニークな制限酵素認識部位を有することを特徴とする、アデノウイルスベクターである。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2000 年第 161577 号および同 2001 年第 131688 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のベクタープラスミドの特徴を示す。(A) ベクタープラスミド pAdHM15, 16, 17 および 18 は、E1/E3 欠損アデノウイルスゲノム DNA を含み、このゲノム DNA の 32679 位と 32680 位との間に Csp45I および／または ClaI 部位を含み、E1 欠損領域に I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位を含む。(B) 各ベクタープラスミドについて、外来オリゴヌクレオチド挿入部位周辺の配列を示す。外来オリゴヌクレオチドはイタリック体で示す。(C) 各プラスミドベクター用に合成するオリゴヌクレオチドを示す。pAdHM15 については、オリゴヌクレオチドが挿入された陽性のクローンが、Csp45I では切断されるが ClaI では切断されないように設計した時のオリゴヌクレオチドが示されている。

図 2 は、ファイバーノブの HI ループに RGD-4C ペプチドを含有し、E1 欠損領域に LacZ 発現カセットを含有するアデノウイルスベクターの構築計画を示す。

図 3 は、制限エンドヌクレアーゼ分析の結果を示す。(A) ベクタープラスミド (pAdHM15-RGD もしくは pAdHM15-RGD-LacZ) またはファイバー中に RGD ペプチドを有する LacZ 発現組換えアデノウイルス DNA (AdHM15-RGD-LacZ) を HindIII/PacI、Csp45I/PacI、HindIII または Csp45I で消化し、0.7% アガロースゲル上で電位泳動した結果である。

レーン 1 : 1 kb DNA ラダーマーカー。

レーン 2 : HindIII/PacI 消化した pAdHM15-RGD。

レーン 3 : Csp45I/PacI 消化した pAdHM15-RGD。

レーン 4 : HindIII/PacI 消化した pAdHM15-RGD-LacZ。

レーン 5 : Csp45I/PacI 消化した pAdHM15-RGD-LacZ。

レーン 6 : HindIII 消化した AdHM15-RGD-LacZ ウイルス DNA。

レーン 7 : Csp45I 消化した AdHM15-RGD-LacZ ウイルス DNA。

(B) 組換えアデノウイルスベクター (AdHM15-RGD-LacZ) の HindIII と Csp45I 制限地図を示す。断片のサイズ (kb) をゲノムの上下に示す。CMV はサイトメガロウイルス中

間-初期プロモーター／エンハンサーを表わし、P (A) はウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを表わす。

図4は、ファイバーノブのHI ループに RGD-4C ペプチドを含有し、E1 欠損領域に Luc 発現カセットを含有するアデノウイルスベクターの構築計画を示す。

図5は、AdHM4-LacZ と AdHM15-RGD-LacZ により形質導入された培養細胞における LacZ 発現を比較した図である。(A) LacZ 発現を発光アッセイにより測定した結果。図中 (a)、(b) はそれぞれ、ベクター粒子を (a) 1200 個／細胞、(b) 8000 個／細胞用いた場合の結果を示す。データは 3 回ずつ行なった試験データの平均値±S. D. で示す。(B) CHO 細胞 (ベクター粒子 1200 個／細胞) における X-gal 染色の結果。(a) は AdHM4-LacZ、(b) は AdHM15-RGD-LacZ についての結果である。

図6は、AdHM4-L2、AdHM15-RGD-L2 および AdHM15-NGR-L2 により形質導入された培養細胞における Luc 発現を比較した図である。それぞれ AdHM4-L2 は白丸 (○)、AdHM15-RGD-L2 は黒丸 (●)、AdHM15-NGR-L2 は黒三角 (▲) で示す。(A) SK HEP-1 細胞における Luc 発現を測定した結果。(B) LN444 細胞における Luc 発現を測定した結果。データは 4 回ずつ行なった試験データの平均値±S. D. で示す。

発明の詳細な説明

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明のファイバーミュータントアデノウイルスベクターの作製方法は、ファイバーの HI ループコード遺伝子配列にユニークな制限酵素認識配列を挿入し、該遺伝子配列中に外来ペプチドコード DNA を導入することを特徴とするものである。

ファイバーの HI ループコード遺伝子配列とは、ファイバー分子のアミノ酸 537 から 549 までの領域をコードする塩基配列をさす。HI ループのアミノ酸は大部分が親水基であり、ノブ領域の外側に配向している。この領域に外来ペプチドが挿入されてもファイバーの 3 量体形成には影響を及ぼさない。例えば、5 型アデノウイルスでは、該ウイルスのゲノム DNA の 32647～32685 番目に相当する。

ユニークな制限酵素認識配列とは、アデノウイルスゲノム DNA に本来存在しない制

制限酵素認識配列を意味し、例えば、制限酵素 Csp45I、ClaI、SwaI、PacI、I-CeuI、PI-SceI、I-PpoI、I-SceI により認識される配列が挙げられる。

ユニークな制限酵素として Csp45I および ClaI を使用した場合、これらの制限酵素は互いに適合性を有する接着型末端を生じ、上記オリゴヌクレオチドをいずれの方向でも挿入することができる。従って、オリゴヌクレオチドが順方向に挿入されたもの（陽性クローン）が Csp45I 認識配列を有し、かつ ClaI 認識配列を含まないように前記オリゴヌクレオチドを設計することにより、陽性クローンを制限酵素 Csp45I および ClaI の切断パターンの違いにより容易に同定することができる。このように設計されたオリゴヌクレオチドとしては、限定するものではないが、配列番号 10～13 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを挙げるることができる。

上記認識配列の HI ループコード遺伝子配列への挿入は、例えば本実施例に記載したようにして実施することができる。

外来ペプチドをコードする DNA の導入は、例えば、該ペプチドコード DNA と上記のユニークな制限酵素認識配列とを有するオリゴヌクレオチド DNA を合成し、対応する酵素で消化した HI ループコード配列に直接ライゲーションすることによって達成することができる。

外来ペプチドをコードする DNA としては、限定されるものではないが、例えば、RGD を含むペプチドをコードする DNA、NGR を含むペプチドをコードする DNA、ヘパラン硫酸との親和性を有するペプチド (KKKKKKK : 配列番号 1) をコードする DNA、ラミニン受容体との親和性を有するペプチド (TS (GYIGSR)₃SS : 配列番号 2 または TSAA (SIKVAV)₂ : 配列番号 3) をコードする DNA、E-セ렉チンとの親和性を有するペプチド (TRSDITWDQLWDLMKTS : 配列番号 4) をコードする DNA 等を選択することにより、ベクターの行き先（組織・細胞等）における遺伝子導入効率を改善することができる。従って、外来ペプチドとして例えば腫瘍血管内皮細胞に対して指向性を有することが報告されているペプチド、例えば RGD や NGR を含むペプチドを選択すれば、種々の腫瘍の治療に有用なベクターを作製することができる。

RGD を含むペプチドとしては、RGD 配列を含みかつ細胞表面のインテグリンに対する結合親和性を有する限り限定されるものではないが、例えば、RGD を含めて 5～20 個

のアミノ酸からなるものが好ましく、具体的には、例えば、RGD-4C ペプチド (CDCRGDCFC：配列番号 5) を挙げることができる。

外来ペプチドとして RGD-4C ペプチドを選択した場合、該ペプチドは CAR だけでなくインテグリンとも結合親和性を有することから、アデノウイルス感受性の細胞だけでなく、CAR の発現が乏しいために従来のウイルスベクターが適用できない細胞、例えば、CHO 細胞、気道上皮細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、T 細胞、マクロファージ、造血幹細胞、樹状細胞、インテグリンを細胞表面に有する癌細胞（例えばヒトグリオーマ細胞 LN444）等への遺伝子導入効率を改善することができる。

また NGR を含むペプチドとしては、NGR 配列を含みかつ細胞表面のアミノペプチダーゼ N (CD13) に対する結合親和性を有する限り限定されるものではないが、例えば、NGR を含めて 5～20 個のアミノ酸からなるものが好ましく、具体的には、例えば、NGR 関連ペプチド (CNGRCVSGCAGRC：配列番号 6) を挙げることができる。

外来ペプチドとして NGR 関連ペプチドを選択した場合、該ペプチドは CAR だけでなくアミノペプチダーゼ N/CD13 とともに結合親和性を有することから、アデノウイルス感受性の細胞だけでなく、CAR の発現が乏しいために従来のウイルスベクターが適用できない細胞、例えば癌新生血管等の CD13 発現細胞（例えばヒトグリオーマ細胞 LN444）への特異的な遺伝子導入を達成することができる。

本発明の好適な実施形態

以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

実施例 1

ファイバーの HI ループに外来ペプチドを付与した

アデノウイルスベクターの作製－1

本実施例では、ファイバーの HI ループをコードする遺伝子配列部分にユニークな制限酵素である Csp45I および ClaI の認識部位を利用した。

まず、ベクタープラスミド pAdHM15, 16, 17 および 18 を以下のようにして構築した。

5 型アデノウイルスゲノムの右末端部 (27331 位の塩基から右末端まで (途中、27865 ~30995 位 (E3 領域) は欠損している) を含むプラスミド pEco-ITR1 を制限酵素 ApaI および MunI で切断した。これを pBR-322 由来のプラスミド pBR-AM2 (AatII と BsaI の認識配列の間に AgeI と MunI の認識配列を有し、PvuII 認識配列から Bst 1107I の認識配列までが欠損している) の ApaI/MunI 制限断片と連結することにより、pBR-AM3 を得た。この pBR-AM3 はアデノウイルスゲノムの 31905~32825 位を有していた。

次に、pBR-AM3 の ApaI/AseI 制限断片、ApaI/BsmAI 制限断片、BsaAI 制限断片、ならびにオリゴヌクレオチド 1 (5' - AACAGGAGACACAACTTCGAAC [ATCGAT] CCAAGTGCATACTCTATGTCATTTTCATGGGACTGGTCTGGCCACAACCTACAT-3' : 配列番号 7) および 2 (5' - TAATGTAGTTGTGGCCAGACCAGTCCCATGAAAATGACATAGAGTATGCACTTGG [ATCGAT] GTTTCAAGTTGTGTCTCC-3' : 配列番号 8) を使用 (Csp45I および ClaI (ジアンチピリルメタン (Dam) でメチル化されている) 認識部位をそれぞれ下線および括弧 [] で示す) して、4-ピースライゲーション反応を行ない、プラスミド pBR-AM4 を得た。

さらに、pBR-AM4 の HpaI/MunI 制限断片と pEco-ITR5 (5 型アデノウイルスゲノムの右末端 (27331 位の塩基からゲノムの右末端まで (途中、28133~30818 位 (E3 領域) が欠損している)) を含む) の HpaI/MunI 制限断片とを連結して pEco-AM4 を構築した。

最後に、pAdHM2 の誘導体である pAdHM2-1 の SrfI/ClaI 制限断片と上記 pEco-AM4 の SrfI/ClaI 制限断片とを連結し、その後アデノウイルスゲノムの右末端の ClaI 認識配列を、オリゴヌクレオチド 3 (5' - CGTTAATAA-3' : 配列番号 9 ; PacI 認識配列を下線で示す) を用いてライゲーションすることにより、PacI 認識配列に置き換えて pAdHM15 を得た。また、pAdHM16, 17 および 18 も同様にして構築した (図 1 A)。

これらのプラスミド pAdHM15, 16, 17 および 18 は E1/E3 領域を除く全アデノウイルスゲノムを有しており、E1 欠損領域にはユニーク部位の I-CeuI、SwaI、および PI-SceI 認識配列を、またゲノム 32679 位と 32680 位 (それぞれ、ファイバタンパク質のトレオニン残基 (546 位) およびプロリン残基 (547 位) に対応している) の間には、それぞれ Csp45I と ClaI (Dam でメチル化されている) (pAdHM15)、ClaI (pAdHM16)、Csp45I (pAdHM17, 18) 認識配列を有していた (図 1)。それぞれのプラスミドの HI ループ

領域は、制限酵素認識配列の違いにより、新たに付与された 2~3 アミノ酸が異なっており、目的に応じて使い分けることができる。

次に、外来ペプチドに対応するオリゴヌクレオチド DNA を有するプラスミドベクターを構築した。

外来ペプチドとして、RGD-4C ペプチド (CDCRGDCFC : 配列番号 5) を選択し、このペプチドに対応するオリゴヌクレオチド DNA (オリゴヌクレオチド 4 および 5) を使用した。

まず、上記で構築した pAdHM15 を、Csp45I/ClaI で切断し、オリゴヌクレオチド 4 (5' - CGAAGTGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTG - 3' : 配列番号 10) および 5 (5' - CGCAGAAACAGTCTCCGCGGCAGTCACACTT - 3' : 配列番号 11) と連結した。

次いで、連結した上記 DNA を大腸菌 DH5 株に導入して形質転換し、pAdHM15-RGD を得た (図 2)。pAdHM15, 16, 17 および 18 について、外来オリゴヌクレオチドの挿入部位周辺の配列、および各ベクタープラスミドに対して合成されうるオリゴヌクレオチドを図 1 (それぞれ B、C) に示す。

制限酵素 Csp45I および ClaI は互いに適合性を有する接着型末端を生じ、上記オリゴヌクレオチドをいずれの方向でも挿入することができるため、陽性プラスミド (オリゴヌクレオチドが順方向に挿入されたもの) が Csp45I 認識配列を有し、かつ ClaI 認識配列を含まないように、これらのオリゴヌクレオチドを設計した (図 2)。自己連結させたプラスミド、および上記オリゴヌクレオチドが逆方向に連結されているプラスミドでは、いずれも Csp45I 認識配列を有していなかった。このため、陽性クローンを制限酵素 Csp45I および ClaI の切断パターンの違いにより容易に同定することができた。さらに、pAdHM15-RGD に挿入されたオリゴヌクレオチドの配列を遺伝子配列解析によって決定することにより、クローンが適切な配列を含んでいることを確認した。

次いで、シャトルプラスミド pHCMV5 (H. Mizuguchi, M. A. Kay., A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. Hum. Gene Ther. 10 (1999) 2013-2017) に pCMV β (クロンテック社) 由来の β ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入することにより、pHCMVLacZ-1 を作製した。

さらに、I-CeuI/PI-SceI で消化した pAdHM15-RGD および pHCMVLacZ-1 を in vitro

ライゲーションにより連結し、pAdHM15-RGD-LacZ を構築した (図 2)。ここで、I-CeuI および PI-SceI は、それぞれ少なくとも 9~10、11 塩基からなる配列を認識する稀な切断酵素である。

野生型ファイバータンパク質を有する対照ウイルス調製用プラスミドとして、pAdHM4 と pHCMVLacZ-1 とを連結して pAdHM4-LacZ を構築した。

上記 pAdHM15-RGD-LacZ と pAdHM4-LacZ はいずれも、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター駆動性 LacZ 遺伝子およびウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化シグナルを含んでいた。

次に、上記 2つのプラスミド pAdHM15-RGD-LacZ および pAdHM4-LacZ を PacI で消化して線状化し、これをフェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿に供して精製した。線状化した pAdHM15-RGD-LacZ と pAdHM4-LacZ を 293 細胞にトランスフェクトして各プラスミド由来のウイルスを調製し (AdHM15-RGD-LacZ、AdHM4-LacZ)、CsCl₂ 段階勾配超遠心、次いで CsCl₂ 直線勾配超遠心に供して精製した。

ウイルス粒子の力価は Maizel らの方法 (Maizel, J. V. J., White, D. O. and Scharff, M. D. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. Virology. 36, 115-125.) に従い、ウイルス DNA を分光光学的に測定した。その結果、AdHM15-RGD-LacZ の力価は 5.28×10^{11} particle titer/mL、AdHM4-LacZ の力価は 2.02×10^{12} particle titer/mL であった。

また、ベクタープラスミド (pAdHM15-RGD もしくは pAdHM15-RGD-LacZ) またはファイバー中に RGD ペプチドを有する LacZ 発現組換えアデノウイルス DNA (AdHM15-RGD-LacZ) について、DNA 制限分析 (制限酵素として HindIII/PacI、Csp45I/PacI、HindIII または Csp45I を使用し、0.7% アガロースゲル上で電気泳動) を行なった。各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : 1 kb DNA ラダーマーカ。

レーン 2 : HindIII/PacI 消化した pAdHM15-RGD。

レーン 3 : Csp45I/PacI 消化した pAdHM15-RGD。

レーン 4 : HindIII/PacI 消化した pAdHM15-RGD-LacZ。

レーン 5 : Csp45I/PacI 消化した pAdHM15-RGD-LacZ。

レーン 6 : HindIII 消化した AdHM15-RGD-LacZ ウイルス DNA。

レーン 7 : Csp45I 消化した AdHM15-RGD-LacZ ウイルス DNA。

結果を図 3 A に示す。

(結果)

結果より、LacZ カセットを含むかまたは含まないベクタープラスミド、すなわち、pAdHM15-RGD、pAdHM15-RGD-LacZ、あるいはウイルス DNA、即ち、AdHM15-RGD-LacZ が、予想された断片 (表 1) を含むことが示された (図 3)。

表 1

pAdHM15-RGD、pAdHM15-RGD-LacZ および AdHM15-RGD-LacZ を
各制限酵素で消化した際に得られる断片の長さ

制限酵素	断片の長さ (kb)
pAdHM15-RGD	
HindIII/PacI	3.0, 3.1, 5.1, 2.1, 4.6, 8.0, 3.1, 2.9, 1.0
Csp45I/PacI	3.0, 3.3, 26.6
pAdHM15-RGD-LacZ	
HindIII/PacI	3.0, 4.8, 3.0, 5.1, 2.1, 4.6, 8.0, 3.1, 2.9, 1.0
Csp45I/PacI	3.0, 3.3, 31.3
AdHM15-RGD-LacZ	
HindIII	4.8, 3.0, 5.1, 2.1, 4.6, 8.0, 3.1, 2.9, 1.0
Csp45I	3.3, 31.3

得られたベクター AdHM15-RGD-LacZ の遺伝子導入効率を、後述の実施例 4 において解析した。

実施例 2

ファイバーの HI ループに外来ペプチドを付与した

アデノウイルスベクターの作製 - 2

ベクタープラスミド pAdHM15-RGD の構築方法は、実施例 1 に示した通りである。

シャトルプラスミド pHCMV6 (H. Mizuguchi, M. A. Kay., A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. Hum. Gene Ther. 10 (1999) 2013-2017) に pGL3-Control (プロメガ社) 由来のルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を挿入することにより、pCMVL1 を作製した。

さらに、前記 pAdHM15-RGD およびルシフェラーゼをコードした pCMVL1 を I-CeuI / PI-SceI で消化後、in vitro ライゲーションにより連結して pAdHM15-RGD-CMVL2 を構築した (図 4)。

野生型ファイバタンパク質を有する対照ウイルス調製用プラスミドとして、pAdHM4 と pCMVL1 とを連結して pAdHM4-CMVL2 を構築した。

上記 pAdHM15-RGD-CMVL2 と pAdHM4-CMVL2 はいずれも、CMV プロモーター駆動性 Luc 遺伝子および BGH ポリアデニル化シグナルを含んでいた。

次に、上記 2 つのプラスミド pAdHM15-RGD-CMVL2 および pAdHM4-CMVL2 を PacI で消化して線状化し、これをフェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿に供して精製した。線状化した pAdHM15-RGD-CMVL2 と pAdHM4-CMVL2 を 293 細胞にトランスフェクトして各プラスミド由来のウイルスを調製し (AdHM15-RGD-L2、AdHM4-L2)、CsCl₂ 段階勾配超遠心、次いで CsCl₂ 直線勾配超遠心に供して精製した。

得られたベクター AdHM15-RGD-L2 および AdHM4-L2 (対照) の遺伝子導入効率を、後述の実施例 5 において解析した。

実施例 3

ファイバーの HI ループに外来ペプチドを付与した

アデノウイルスベクターの作製 - 3

ベクタープラスミド pAdHM15 の構築方法は、実施例 1 に示した通りである。

外来ペプチドとして、NGR 関連ペプチド (CNGRCVSGCAGRC : 配列番号 6) を選択し、このペプチドに対応するオリゴヌクレオチド DNA (オリゴヌクレオチド 6 および 7) を使用した。

まず、上記で構築した pAdHM15 を、Csp45I / ClaI で切断し、オリゴヌクレオチド 6

(5' - CGGCTGCAACGGCCGCTGCGTGAGCGGCTGCGCCGGCCGCTG - 3' : 配列番号 1 2) および 7 (5' - CGCAGCGGCCGGCGCAGCCGCTCACGCAGCGGCCGTTGCAGC - 3' : 配列番号 1 3) と連結した。次いで、連結した上記 DNA を大腸菌 DH5 株に導入して形質転換し、pAdHM15-NGR を得た。

I-CeuI/PI-SceI で消化した pAdHM15-NGR および pCMVL1 を in vitro ライゲーションにより連結し、pAdHM15-NGR-CMVL2 を構築した。pAdHM15-NGR-CMVL2 は、CMV プロモーター駆動性 Luc 遺伝子および BGH ポリアデニル化シグナルを含んでいた。

次に、プラスミド pAdHM15-NGR-CMVL2 を PacI で消化して線状化し、これをフェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿に供して精製した。線状化した pAdHM15-NGR-CMVL2 を 293 細胞にトランスフェクトしてプラスミド由来のウイルス (AdHM15-NGR-L2) を調製し、CsCl₂ 段階勾配超遠心、次いで CsCl₂ 直線勾配超遠心に供して精製した。

得られたベクター AdHM15-NGR-L2 の遺伝子導入効率を、後述の実施例 5 において解析した。

実施例 4

遺伝子導入効率の解析 - 1

実施例 1 で作製したベクター AdHM15-RGD-LacZ 中に挿入した RGD-4C ペプチドの機能を調べるために、AdHM15-RGD-LacZ および AdHM4-LacZ (対照) の遺伝子導入効率を、CAR の発現を有しアデノウイルスに感受性の SK-HEP1 細胞と、非感受性 (CAR の発現がないため) の CHO 細胞を用いて解析した。ここで、SK-HEP1 細胞はヒト肝臓血管内皮細胞に由来し、Dr. Mark A. Kay (Stanford Univ.) より供与されたものである。また CHO 細胞 (chinese hamster ovary cell) は、Dr. Tadanori Mayumi (真弓忠範博士、大阪大学) より供与されたものである。

まず、SK-HEP1 細胞および CHO 細胞を、AdHM15-RGD-LacZ と AdHM4-LacZ のベクター粒子 1200 個/細胞および 8000 個/細胞のスケールで 1.5 時間形質転換した。

2 日後、LacZ タンパク質の発現 (すなわち LacZ 酵素活性) を、発光 β-ガラクトシダーゼ検出キット (クロンテック社) を用いた発光アッセイおよび X-gal (5-ブロモ-4-ク

ロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド) 染色により確認した (図 5)。LacZ 酵素活性の程度は、キットに付属の標準物質を指標として評価した。

(結果)

SK HEP-1 細胞では、AdHM15-RGD-LacZ (RGD ファイバー) と AdHM4-LacZ (野生型ファイバー) での形質転換後に検出された LacZ 酵素活性の差は 2 倍程度であったが (図 5 A)、CHO 細胞においてはその差は 40 倍にも達し、AdHM15-RGD-LacZ で形質転換した方がその活性が高かった。また、AdHM15-RGD-LacZ および AdHM4-LacZ で形質転換した CHO 細胞における X-gal 陽性細胞の割合は、上記発光アッセイの結果と非常によく相関していた (図 5 B)。

これらのことから、RGD ファイバーを有する AdHM15-RGD-LacZ が RGD-CAR 結合経路だけでなく RGD-インテグリン結合経路でも感染し、遺伝子を効率的に導入できることが確認された (ペントンベースの RGD モチーフとインテグリンとの結合は、感染の第一ステップとしては働かないことが知られている)。

尚、AdHM15-RGD-LacZ は CAR とインテグリンのどちらを経由しても感染できるため、SK-HEP1 細胞では AdHM4-LacZ に比べやや遺伝子導入効率が高くなったものと考えられる。

従って、ファイバーに RGD-4C ペプチドを付与することにより、CHO 細胞等の CAR 欠損細胞に効率的に遺伝子を導入できることが示された。

実施例 5

遺伝子導入効率の解析 2

実施例 2 で作製したベクター AdHM15-RGD-L2 中に挿入した RGD-4C ペプチドおよび、実施例 3 で作製したベクター AdHM15-NGR-L2 中に挿入した NGR 関連ペプチドの機能を調べるために、AdHM15-RGD-L2、AdHM15-NGR-L2 および AdHM4-L2 (対照) の遺伝子導入効率を、CAR の発現を有しアデノウイルスに感受性の SK-HEP1 細胞と、非感受性 (CAR の発現がないため) の LN444 細胞を用いて解析した。ここで、LN444 細胞はヒトグリオーマ細胞であり、Dr. Mitsuhiro Tada (多田光宏博士、北海道大学) より供与された

ものであり、その細胞表面には RGD ペプチドのターゲットインテグリン ($\alpha v\beta 3$ あるいは $\alpha v\beta 5$) およびアミノペプチダーゼ N/CD13 を発現している。

まず、SK-HEP1 細胞および LN444 細胞それぞれ 5×10^4 個を、AdHM4-L2、AdHM15-RGD-L2 および AdHM15-NGR-L2 のベクター粒子 100 個/細胞、300 個/細胞、1000 個/細胞および 3000 個/細胞のスケールで 1.5 時間形質転換した。

2 日後、ルシフェラーゼ (Luc) タンパク質の発現 (すなわち Luc 酵素活性) を、ルシフェラーゼレポーターアッセイキット (クロンテック社) を用いて確認した (図 6)。

(結果)

SK HEP-1 細胞では、AdHM15-NGR-L2 (NGR ファイバー; ▲) と AdHM4-L2 (対照: 野生型ファイバー; ○) での形質転換後に検出された Luc 酵素活性の差は 2 倍程度であったが、AdHM15-RGD-L2 (RGD ファイバー; ●) においてはその差は 10 倍に達し、AdHM15-RGD-L2 で形質転換した方がその活性が高かった (図 6 A)。LN444 細胞においては、AdHM15-NGR-L2 (▲) と AdHM4-L2 (対照; ○) での形質転換後に検出された Luc 酵素活性の差は 100 倍に達し、AdHM15-NGR-L2 で形質転換した方がその活性が高かった。また、AdHM15-RGD-L2 (●) においてはその差は約 1000 倍に達した (図 6 B)。尚、図 6 横軸中の「VP」は、vector particles (ベクター粒子数) を示す。

これらのことから、RGD ファイバーを有する AdHM15-RGD-L2 が、RGD-CAR 結合経路だけでなく RGD-インテグリン結合経路でも感染し、遺伝子を効率的に導入できることが再度確認された。さらに、NGR ファイバーを有する AdHM15-NGR-L2 が RGD-CAR 結合経路だけでなく NGR-CD13 結合経路でも感染し、遺伝子を効率的に導入できることが確認された。

従って、ファイバーに NGR 関連ペプチドを付与することにより、LN444 細胞等の CD13 発現細胞に効率的に遺伝子を導入できることが示された。

本明細書中で引用した全ての文献は、そのまま参考として本明細書中に取り入れるものとする。

本発明の方法では、1 ステップの *in vitro* ライゲーションにより、任意のペプチド

をファイバーIII ループコード遺伝子配列に導入することができる。従って、遺伝子導入効率の高いアデノウイルスベクターを簡易な操作により作製することができる。

09045160 "050101
T0T050" 09T54860

請 求 の 範 囲

1. ファイバーのHI ループコード遺伝子配列に、ユニークな制限酵素認識配列を挿入し、該遺伝子配列中に外来ペプチドコード DNA を導入することを特徴とする、ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの作製方法。
2. ユニークな制限酵素がCsp45I および／またはClaI である、請求項1 記載の方法。
3. 外来ペプチドが腫瘍血管内皮細胞に対して指向性を有するペプチドである、請求項1 記載の方法。
4. 外来ペプチドが腫瘍血管内皮細胞に対して指向性を有するペプチドである、請求項2 記載の方法。
5. 腫瘍血管内皮細胞に対して指向性を有するペプチドがトリペプチド：R-G-D を含むペプチドである、請求項3 記載の方法。
6. 腫瘍血管内皮細胞に対して指向性を有するペプチドがトリペプチド：R-G-D を含むペプチドである、請求項4 記載の方法。
7. 腫瘍血管内皮細胞に対して指向性を有するペプチドがトリペプチド：N-G-R を含むペプチドである、請求項3 記載の方法。
8. 腫瘍血管内皮細胞に対して指向性を有するペプチドがトリペプチド：N-G-R を含むペプチドである、請求項4 記載の方法。
9. 請求項1 記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルスベクター。
10. 請求項2 記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルスベクター。
11. 請求項3 記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルスベクター。
12. 請求項4 記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルスベクター。
13. 請求項5 記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルス

スペクター。

14. 請求項6記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルススペクター。

15. 請求項7記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルススペクター。

16. 請求項8記載の方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルススペクター。

17. ファイバーのHI ループコード遺伝子配列に、ユニークな制限酵素部位を有することを特徴とする、アデノウイルススペクター。

18. ユニークな制限酵素がCsp45I および／またはClaI である、請求項17記載のアデノウイルススペクター。

要 約 書

本発明により、アデノウイルスのファイバーのHI ループに外来ペプチドが付与されたファイバーミュータントアデノウイルスベクターの簡便な作製方法、および該方法により作製されるファイバーミュータントアデノウイルスベクターが提供される。